

金黄色葡萄球菌 C₁、C₂ 型肠毒素的 提纯及某些理化性质的鉴定

雷柞荣 曲丽云 王鲁明

(军事医学科学院微生物流行病学研究所,北京)

金黄色葡萄球菌能产生多种胞外毒性物质,易引起人和少数动物的胃肠炎,故称做肠毒素。按照它们同特异性抗体的反应分为六个血清型: A、B、C、D、E 和 F。由于等电点的不同, C 型又分为 C₁ 及 C₂ 型。C₁ 型由 Borja(1965)^[1] 首次提纯, C₂ 型由 Avena 等^[2] 提纯。提纯方法是离子交换层析和凝胶过滤。近来还报道了用 QAE-Sephadex^[3], CM-Sephadex^[4] 等提纯方法。我们参照 Borja 等人的方法做了某些改进, 提取出了纯度较好, 供免疫使用的 C₁、C₂ 型肠毒素。

材 料 和 方 法

(一) 材料

1. 菌株: FRI₁₃₇ 株(产 C₁ 型肠毒素)和 FRI₁₆₁ 株(产 C₂ 型肠毒素), 由 Bergdoll 教授供给。

2. 培养基: 在胰酶消化酪蛋白培养基中加

入 0.001% 烟酸、0.0001% 维生素 B₁ 等。

3. 羧甲基纤维素 (CM-22): 粒子直径 40—100 目, Whatman 厂产。临用前纤维素过筛, 用蒸馏水浮选, 去掉细微粒子。然后用碱和酸交替处理, 直至洗出液中性为止, 以初始缓冲液平衡, 装柱。

4. Sephadex G-75: 粒子直径 40—120 目, Pharmacia 厂产。干粉凝胶使用前用蒸馏水浸泡膨胀, 排除气泡, 浮选去除细颗粒。装柱, 用磷酸缓冲液平衡。

5. 参考标准 C₁、C₂ 型肠毒素及其对应抗血清由 Bergdoll 教授提供。

6. LKB 4900A 再循环层析仪、LKB 厂制。

(二) 方法

1. 产毒: 用玻璃纸覆盖琼脂法培养^[5], 37°C

等电点由本院基础所田洁同志测定, 特此致谢。

孵育 48 小时,除菌留上清液备用。

2. 肠毒素含量测定: Oudin 试验稍作改进,扩散管直径变小,用国产琼脂糖,抗血清浓度降低,扩散时间缩短。

3. 蛋白含量测定: 测定仪器,日立 557 型双光束双波长紫外分光光度计。波长 280 nm,以卵白蛋白作标准曲线。

4. 聚丙烯酰胺圆盘电泳: 凝胶浓度 7.5%。电极缓冲液 Tris-甘氨酸 pH 8.9, 电流强度 4 mA/管。电泳时间 60 分钟。以 0.025% 考马斯亮蓝染色。

5. 含糖量测定: 蒽酮比色定糖法^[6]。

6. 等电点测定: LKB 等电点聚焦仪测定,使用安福林(本院二所制)和聚丙烯酰胺凝胶板。

结 果

(一) 金黄色葡萄球菌 C₁ 型肠毒素的提纯

参考 Borja^[4] 等方法,仅用 CM-纤维素层析分离。粗肠毒素溶液预先用聚乙二醇浓缩 20 倍左右。冷冻干燥,用前以 0.001 M pH 5.5 磷酸缓冲液(简称 PB)溶解和透析平衡,将 2.35g 蛋白量粗毒溶液上于已用 PB 平衡过的 CM-纤维素柱(2.1 × 40cm),上样流速 45 ml/小时。开始用 0.01 M pH 5.5 PB 洗至漏出峰为止,经 Oudin 试验测定该峰不含毒素。接着分步梯度洗脱以 0.02 M pH 6.0 PB 洗出第 I 峰,再换 0.06 M pH 6.8 PB 洗至第 II 峰出现,毒素主要存在该峰。最后以 0.2 M pH 6.8 PB 洗脱出第 III 峰,该峰主要含 β-溶血素和微量毒素,洗脱

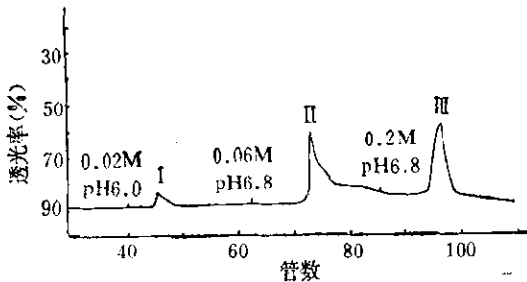


图 1 C₁ 型肠毒素 CM-纤维素柱层析图谱

流速 42 ml/小时,每 10 分钟收集一管,每管 7ml(见图 1)。

收集第 II 峰洗脱液,混合、透析去盐,冷冻干燥,Oudin 试验测毒,毒素纯度 90%。

(二) 金黄色葡萄球菌 C₂ 型肠毒素的提取
按 Avena^[2] 的方法加以改进,先用 CM-纤维素柱提纯,再经过 Sephadex G-75 过滤。

CM-纤维素柱提纯: C₂ 型粗肠毒素冷冻干燥,用前以 0.01 M NaH₂PO₄ 溶液溶解。10000r/min 离心 20 分钟,去掉不溶物,上清液用 0.02 M pH5.4 PB 透析。C₂ 型粗肠毒素溶液比较粘稠,用时需适当稀释。CM-纤维素柱(2.1 × 34cm) 预先用 0.02 M pH 5.4 PB 平衡,上样量 6.5g 蛋白质(约 600 ml 粗毒溶液),上样流速 48ml/小时,以 0.02 M pH5.4 PB 洗出峰,Oudin 试验测定该峰不含有毒素。分步梯度洗脱吸附于柱的毒素,先以 0.06 M pH 6.6 PB 洗至第 I 峰完(毒素存在此峰),换 0.2 M pH6.8 洗出第 II 峰(见图 2)。

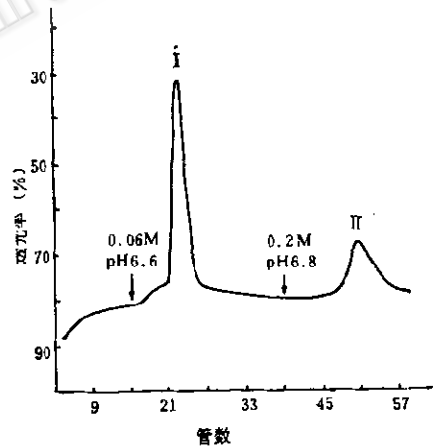


图 2 C₂ 型肠毒素 CM-纤维素柱层析图谱

洗脱流速 42ml/小时。每 10 分钟一管。收集第 I 峰洗脱液,混合。Oudin 试验测毒。这一步提取的肠毒素回收率达 66%,毒素纯度 46%(见表 1)。

Sephadex G-75 过滤:收集的 CM-纤维素柱层析的第 I 峰洗脱液,混合,用 0.01 M pH7.4 PB 透析平衡,通过 Sephadex G-75 柱(2.6 × 62cm) 过滤。上样量 176mg 蛋白质(12ml 溶液),洗脱

表1 金黄色葡萄球菌 C₂ 型肠毒素提纯回收率

	体积 (ml)	蛋白量 (mg/ml)	总蛋白 (mg)	Oudin (mg/ml)	总毒素 (mg)	回收率 (%)	纯度 (%)
粗毒溶液	1770	15.2	26904	0.0312	839.4		
CM-C ₂ I 峰	164	14.7	2410.8	0.46	554.5	66	46
Sephadex G-75 峰	280.8	3.105	871.78	0.98	425.22	77	98

液 0.01 M pH7.4 PB, 洗脱出两个峰, 第 I 及第 II 峰。Oudin 试验测毒结果, 毒素主要存在第 I 峰(见图 3)。收集第 I 峰洗脱液混合。此步层析后, 毒素回收率 77%, 纯度 98% (见表 1)。

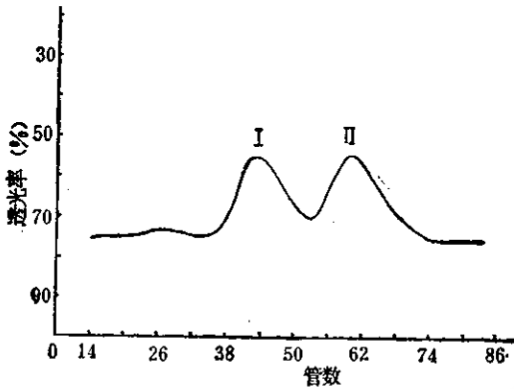


图3 Sephadex G-75 提纯 C₂ 型肠毒素层析图谱

(三) 提纯肠毒素的某些物理化学性质

C₁、C₂ 型粗肠毒素溶液为黄褐色液体, 提纯后变成了无色透明。冷冻干燥后的 C₁、C₂ 型肠

毒素是白色疏松绒毛状物质, 易溶于水和盐溶液。最大吸收光谱是 277nm, 没有核酸, 260nm/280nm 的比值 0.58。不含糖, 蒽酮比色测糖法试验阴性。α-溶血素试验阴性。C₁ 型肠毒素的等电点 pH8.6; C₂ 型 pH7.0。聚丙烯酰胺圆盘电泳鉴定, 提纯前 C₁ 型粗毒溶液有 18 条带, CM-纤维素柱层析提纯后是 7 条(见图 4)。

C₂ 型粗肠毒素溶液 12 条, CM-纤维素提取后减少至 7 条, 再经 Sephadex G-75 提纯仍是 7 条, 但毒素比活性提高了(见图 5)。

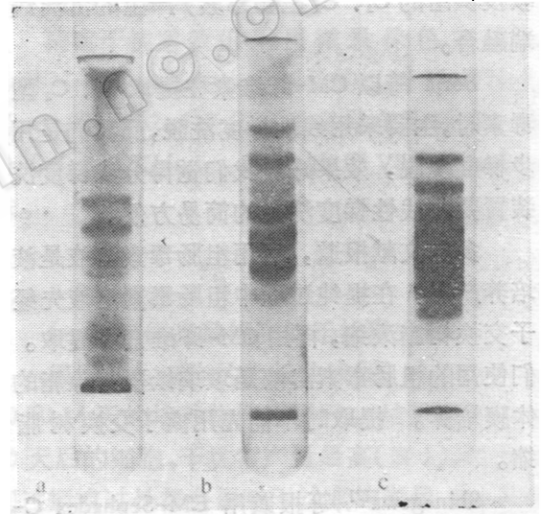


图5 金黄色葡萄球菌 C₂ 型肠毒素的聚丙烯酰胺圆盘电泳。

a. C₂ 型粗肠毒素 (1mg 蛋白) b. CM-纤维素层析 C₂ 型肠毒素 (100µg 蛋白) c. Sephadex G-75 提取的 C₂ 型肠毒素 (100µg 蛋白)。

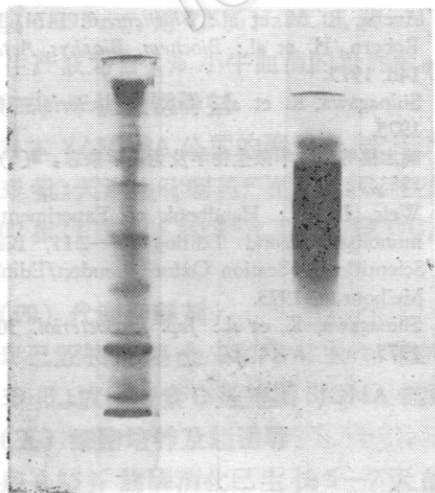


图4 金黄色葡萄球菌 C₁ 型肠毒素的聚丙烯酰胺圆盘电泳。

(左) C₁ 型粗肠毒素 (1mg 蛋白) (右) CM-纤维素提取的 C₁ 型肠毒素 (100µg 蛋白)。

讨 论

提取金黄色葡萄球菌 C₁ 型肠毒素, Barja 采用五步程序: Carbowax 20M 浓缩提取 → CM-纤维素层析 → Sephadex G-75 过滤 → Sephadex G-50 过滤 → Sephadex G-50 过滤, 提纯出的 C₁ 型肠毒素纯度 98%。我们由金黄

色葡萄球菌粗肠毒素溶液提取 C₁ 型肠毒素只用 CM-纤维素柱层析一次, 获得 90% 纯度 C₁ 型肠毒素。Avena 等用下述步骤提取 C₂ 型肠毒素: CM-纤维素柱 $\xrightarrow{\text{分步洗脱}}$ CM-纤维素柱 $\xrightarrow{\text{梯度洗脱}}$ Sephadex G-75 \rightarrow Sephadex G-50 过滤。C₂ 型毒素纯度达到 99%。我们提取 C₂ 型肠毒素是两个步骤: CM-纤维素柱 $\xrightarrow{\text{分步洗脱}}$ Sephadex G-75 过滤, C₂ 型肠毒素纯度为 98%。CM-纤维素层析肠毒素回收率为 66%, 和 Avena 等的实验相似。

用我们提取的纯度为 90% 以上的 C₁、C₂ 型肠毒素作免疫原, 注射了一批家兔, 获得了效价较高(琼脂扩散 1:128)、特异性好的 C₁、C₂ 型抗血清。双向琼脂扩散实验鉴定, 这些血清对于我们的 C₁、C₂ 型抗原和参考标准抗原 (Bergodll 教授供给的 C₁、C₂ 型肠毒素) 产生的沉淀线尖端融合。

Borja 等以 CM-纤维素柱提取 C₁、C₂ 型肠毒素时, 主要采用线性梯度洗脱, 而我们是用分步梯度洗脱, 效果好。我们觉得分步梯度洗脱装置要比线性梯度洗脱的简易方便。

多数文献报道, 所用粗肠毒素溶液是液体培养产毒, 在提纯过程中粗肠毒素溶液先经离子交换树脂浓缩, 再用 CM-纤维素等提取。我们使用的粗肠毒素溶液是玻璃纸覆盖琼脂的固体膜培养。提取时不需先用离子交换树脂浓缩。

Shinagawa^[7] 等报道用 CM-Sephadex C-25 提取 C 型肠毒素, 程序简单而获得好结果。我们也试图以 CM-Sephadex C-50 提纯 C 型肠毒素, 发现两个问题, 一是不同 pH 缓冲液洗脱时柱床体积变化很大。二是在第二次使用时分离效果显著下降。

金黄色葡萄球菌 C₁、C₂ 型肠毒素致病性、血清学反应一样, 聚丙烯酰胺圆盘电泳沉淀带位置相同。在目前实验技术条件下, 两型毒素的分子量、沉淀系数等未发现不同。进一步的研究表明, 两者还是有差别的, 比较明显的是等电点不同, 纸电泳迁移率不同。所以在提取过程中 C₁、C₂ 型肠毒素对 CM-纤维素吸附 pH 和离子强度不同, C₁ 型肠毒素用 0.01 M pH5.5 PB, C₂ 型肠毒素用 0.02 M pH5.4 PB。洗脱条件也有差异, 前者用 0.06 M pH 6.8 PB 洗出吸附 C₁ 型肠毒素; 后者用 0.06 M pH6.6PB 洗脱。C₂ 型粗肠毒素溶液比 C₁ 型粘稠, 容易造成洗脱流速受阻, 柱床收缩。

提纯的 C₁、C₂ 型肠毒素是无色透明液体, 冷冻干燥后为白色疏松绒毛状。不含有糖、核酸, 最大吸收波长 277nm, α -溶血素试验阴性。C₁ 型肠毒素等电点 pH8.6, C₂ 型 pH 7.0。

聚丙烯酰胺圆盘电泳鉴定, C₁、C₂ 型粗肠毒素溶液沉淀带 12—18 条, 提纯后减少至 7 条。C₂ 型肠毒素 CM-纤维素层析后再经葡聚糖凝胶过滤, 沉淀带未见减少, 但毒素纯度提高 25.8%。

参 考 文 献

- [1] Borja, C. R. et al.: *Biochem.* 6: 1467, 1967.
- [2] Avena, R. M. et al.: *Biochem.* 6: 1474, 1967.
- [3] Robern, H. et al.: *Biochem. Biophys. Acta* 393: 148, 1975.
- [4] Shinagawa, K. et al.: *Jap. J. Bacteriol.* 30: 683, 1975.
- [5] 姚忠禧等: 中华微生物学及免疫学杂志, 3(5): 334, 1983.
- [6] Weir, D. M.: *Handbook of Experimental Immunology*. Second Edition 2.9—2.11, Blackwell Scientific Publication Oxford/London/Edinburgh/Melbourne, 1973.
- [7] Shinagawa, K. et al.: *Jap. J. Bacteriol.* 30: 683, 1975.